

平成23年 4 月 25 日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20780203

研究課題名(和文)

哺乳類減数分裂におけるコンデンシンの役割

研究課題名(英文) Roles of condensins in mammalian meiosis

研究代表者

李 智博 (LEE JIBAK)

独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・協力研究員

研究者番号： 50372660

研究成果の概要(和文)：

申請者は、マウス卵母細胞の減数分裂において、コンデンシン I とコンデンシン II の時空間的な動態を明らかにした。また、二価染色体が形成されるときに、2つのコンデンシンが染色体の凝縮や分離、姉妹動原体の一方方向性の確立に関与することを示した。それと平行して、減数分裂特異的な新規のコヒーシンサブユニット RAD21L を発見した。RAD21L は、第一減数分裂前期にだけ発現し、シナプトネマ複合体上に局在することから、相同染色体の対合や組換えに関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

I clarified the spatiotemporal dynamics of condensin I and condensin II during meiosis of mouse oocytes. In the assembly of bivalent chromosomes, both condensins are involved in chromosome condensation and segregation, and establishment of monopolar attachment of sister kinetochores in meiosis. In addition, I identified a new meiosis-specific cohesin subunit RAD21L. It is suggested that RAD21L might be involved in synapsis and recombination of homologous chromosomes from its specific expression in prophae I and its localization on the synaptonemal complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：減数分裂、コンデンシン、コヒーシン、卵母細胞、精母細胞、相同染色体、二価染色体

## 1. 研究開始当初の背景

我々を生み出すもととなる配偶子(卵子と精子)は、減数分裂と呼ばれる特殊な分裂を経ることにより形成される。この間、染色体数が半減するとともに、父母由来のゲノムの組み合わせが一新される。減数分裂では、体細胞分裂と異なり、DNA複製後に2段階の分裂が起こり、とりわけ第一減数分裂では染色体は特有な動きを示す。相同染色体が対合・組み換えを起こす結果、第一減数分裂中期に二価染色体を形成する。そして後期には、姉妹染色分体の接着はセントロメア部分で維持されたまま、染色体腕部の接着が失われることにより、相同染色体が分離する。また、このときには、姉妹染色分体上のそれぞれのキネトコア(姉妹キネトコア)が同方向を向くように配置されることによって、姉妹染色分体の同一紡錘体極への移動が可能となる。このような染色体の動態は長年観察されてきたことだが、最近までその背景にある分子機構は全くわかっていなかった。

近年、姉妹染色分体の接着に関与するコヒーシン複合体が発見され、酵母からヒトまでその基本的な機能は保存されていることが分かってきた。申請者は、当時酵母において発見されていた減数分裂に特異的に発現するコヒーシンサブユニット Rec8 (Watanabe and Nurse, 1999; Klein ら, 1999)に着目し、その相同タンパク質を哺乳類減数分裂の系で解析した。その結果、Rec8の染色体腕部からの消失およびセントロメア部分からの消失が、それぞれ第一減数分裂における相同染色体の分離と第二減数分裂における姉妹染色分体の分離を引き起こすことを明らかにした (Lee ら, 2002, 2003, 2006; Eijpe ら, 2003; Kudo ら, 2006)。さらに、東大の渡邊研究室と共同して、セントロメアの接着を保護する因子 Shugoshin (Kitajima ら, 2004, 2006)の哺乳類減数分裂における役割についての研究も進めてきた (Lee ら, 2008)。これらの研究成果により減数分裂における染色体の接着・分離の機構は解明されつつあるが、減数分裂のメカニズムを考える上でもう一つの重要な課題が未解決のまま残されている。すなわち、第一減数分裂特有の姉妹キネトコアの同一方向性を制御する機構、そしてそれを第二減数分裂で逆向きに再配向する機構についての問題である。キネトコアは染色体のセントロメア部分を土台として形成されるため、この問題の背景にはコンデンシンによる染色体構築が深く関与するのではないかと推測することができる。そこで、本申請課題では、減数分裂におけるコンデン

シンの役割を解明することを目標とする。

ヒトを含む脊椎動物の体細胞には、2種類のコンデンシン複合体(コンデンシン I とコンデンシン II)が存在する。コンデンシン I と II は、細胞周期過程における局在とダイナミクスの制御の違い、さらにロックダウン細胞の表現型の違いから、染色体の形作りにおいて細分化された役割を演じると考えられている (Ono ら, 2003; 2004)。また、コンデンシンは、分裂期以外にも、リボソーム DNA の維持や遺伝子発現の制御など多彩な染色体機能に関与することも報告されている (Machin ら, 2004; Dej ら, 2004; Tsang ら, 2007)。哺乳類の卵母細胞は、減数分裂前期での長期休止時に、染色体の部分的な脱凝縮や凝縮を起こすが、この時期にもコンデンシンが染色体構築以外の役割を果たしている可能性があり、興味深い。しかし、哺乳類減数分裂におけるコンデンシンの機能解析についての報告はこれまで皆無であり、その細胞内の発現や局在に関する情報も極めて限られたものだけである。

## 2. 研究の目的

マウスの減数分裂過程に発現するコンデンシンサブユニットを組織的に同定し、その局在と機能が減数分裂における染色体の構築と分離にどのように寄与するかを明らかにする。

また、新規の減数分裂特異的なコヒーシンサブユニット RAD21L を発見したので、その動態を明らかにし、減数分裂における役割を検討する。

## 3. 研究の方法

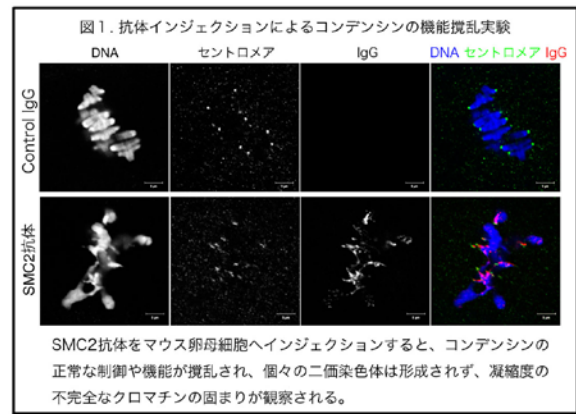
減数分裂におけるコンデンシンの動態や役割を調べるために、まず、マウスコンデンシン複合体の全サブユニット(8個)に対する抗体を作成した。作製した抗体を使用して、マウスの精巣抽出液を材料に、免疫沈降法により、2つのコンデンシン複合体の形成の有無を確認した。その後、各サブユニットの減数分裂における時空間的な発現パターンを解析した。その実験には、減数分裂の各ステージを詳細に観察できる、マウス卵母細胞の体外成熟培養系を利用した。体外成熟させた卵母細胞を固定後、免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。さらに、コンデンシン I と II の機能を明らかにするため、抗体のマウス卵母細胞への顕微注入実験を行った。

それと平行して、生化学的手法とバイオインフォマティックス的手法を併用し、減数分裂特異的に発現する新規のコンデンシンやコヒーシンあるいはその関連因子を探索した。その過程で、新規

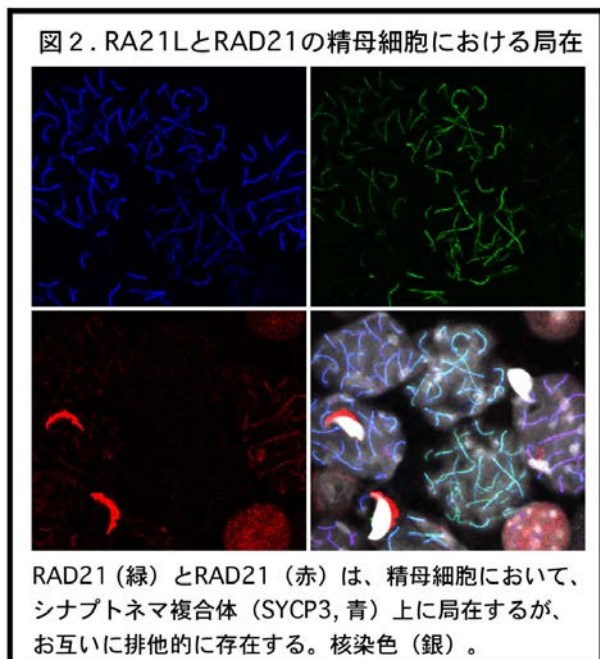
のコヒーシサブユニット RAD21L を発見した。この RAD21L の動態を調べるために、特異的な抗体を作製した。マウスの精巣抽出液を用いた免疫沈降法により、RAD21L とそのパラログである既知の体細胞型コヒーシサブユニット RAD21 や減数分裂型コヒーシサブユニット REC8 を含むコヒーシ複合体の組成を決定した。また、精巣の凍結切片や精母細胞の染色体スプレッドを免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより、それら 3 つのコヒーシサブユニットの時空間ダイナミクスを調べた。

#### 4. 研究成果

申請者は、コンデンシン I と II のサブユニットの動態をマウス卵母細胞の減数分裂過程において調べることにより、2 つのコンデンシンが共に減数分裂過程において発現していることを示した。興味深いことに、減数分裂において、コンデンシンは、体細胞分裂とは異なる時空間制御を受けることが分かった。すなわち、コンデンシン I は体細胞分裂の中期には染色体の軸に沿って局在するのに対し、第一減数分裂中期においては、染色体の腕部分ではほとんど検出されず、セントロメア部分にのみ観察される。また、コンデンシン II も、体細胞分裂では分裂前期（核膜崩壊前）に凝縮し始める染色体上に見られるのに対し、減数分裂では、卵核胞崩壊直後に初めて染色体上に局在し始める。このように減数分裂においてユニークな動態を示すコンデンシンの役割を明らかにするために、卵母細胞に特異的な抗体を顕微注入して、減数分裂の進行と染色体の凝縮や分離にどのような影響が出るかを調べた。コントロールとして、IgG を顕微注入した卵母細胞は、成熟培養後 6 時間後あるいは 16 時間後には、ほとんどのものが第一減数分裂中期あるいは第二減数分裂中期へ正常に進行した。これに対し、コンデンシン I と II の共通サブユニットである SMC2 に対する特異的な抗体を顕微注入したときには、抗体量に依存して、SMC2 の過剰な染色体への凝集が観察されるようになり、キネトコアの配向や染色体の形成・分離に異常が見られた（図 1 参照）。一方、コンデンシン I (CAP-H) やコンデンシン II (CAP-D3) の抗体を顕微注入した場合には、前者ではコンデンシン I がセントロメア周辺部へ過剰に凝集し、後者ではコンデンシン II の染色体への局在が阻害された。また、両者に共通して染色体の形成や分離に異常が認められた。これらの結果から、2 つのコンデンシン複合体は、哺乳類減数分裂においても、正常な染色体の構築や分離に必要であることが示唆された。現在、これらの成果をまとめた論文を投稿中である。



コンデンシンの研究と平行して、減数分裂特異的な新規コヒーシサブユニット RAD21L の動態解析を行った。RAD21L は既知のパラログである RAD21 や REC8 とは異なり、第一減数分裂前期のみ特異的に発現し、シナプトネマ複合体上に局在していた。おもしろいことに、精母細胞において、RAD21L と RAD21 は、お互いに排他的な発現パターンを示す（図 2 参照）。また、減数分裂期の組換えのマーカーとして使用される MLH1 が観察され始めるパキテン期の中頃に、RAD21L はシナプトネマ複合体上から消失した。さらに、精巣抽出液を使用した免疫沈降法により他のコヒーシサブユニットとの複合体の形成の有無を調べたところ、RAD21L は、SMC3, STAG3, そして SMC1 $\alpha$ /SMC1 $\beta$  のどちらか一方と複合体を形成することが分かった。これらの結果から、減数分裂における RAD21L の主要な役割は、姉妹染色分体の接着維持よりもむしろ、相同染色体間の結合の確立（相同染色体の対合や組換え）にあると考えられる。これらの研究成果をまとめ、論文として発表した（Lee and Hirano, J Cell Biol, 2011）。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Jibak Lee and Tatsuya Hirano. (2011). RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *Journal of Cell Biology*, Vol.192, 263-276, 査読有.

[学会発表] (計6件)

① 李智博、マウスにおける減数分裂特異的な新規コヒーシンサブユニットの動態、第33回分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、2010年12月9日、神戸.

② Jibak Lee, Regulation of chromosome dynamics by cohesins in mammalian meiosis, Czech-Japan Joint Symposium for Animal Reproduction “From gametes to stem cells”、2010年9月20日、Bysice, Czech Republic.

③ 李智博、マウス卵母細胞の染色体動態制御におけるコンデンシンの役割、第102回日本繁殖生物学会大会、2009年9月11日、奈良.

④ 李智博、マウス卵母細胞におけるコンデンシンIとIIの動態、第26回染色体ワークショップ、2009年1月27日、姫路.

⑤ Jibak Lee, Molecular mechanisms of meiotic chromosome behavior in mouse oocytes, The 3<sup>rd</sup> Asian Chromosome Colloquium, 2008年12月3日、吹田.

⑥ 李智博、マウス卵母細胞における2つのコンデンシン複合体の挙動、第101回日本繁殖生物学会大会、2008年9月19日、福岡.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

李 智博 (LEE JIBAK)

独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・協力研究員

50372660

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者